جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تولیدآمیلاز توسط سویه بومی *Bacillus SP.* (BC18) مقایسه ای بین اشکال آزاد و تثبیت شده سلول

متین ضیایی ضیابری[۱]، محمد فائزی قاسمی*[۱]، ناصر قائمی[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم،گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- دانشگاه تهران، دانشکده علوم،گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

faezi_m@yahoo.com

چکیده

صد سویه باسیلوس از نمونه های مختلف خاک استان گیلان حاوی کودهای دامی و مرغی جدا گردید. مطابق با روش جداسازی کیفی ۶۰ سویه باسیلوس از سویه های جدا شده، مولد α- آمیلاز بودند. از بین تولید کنندگان α- آمیلاز، *Bacillus SP.*BC18 بر طبق روش کمی بیشترین فعالیت آمیلازی را نشان داد. سلولهای *Bacillus SP.* BC18 به منظورمقایسه تولید آمیلاز با سلولهای آزاد، در بسترهای مختلف شامل آلژینات کلسیم، آگار آگار و ژلاتین تثبیت شدند. تولید آنزیم توسط سلولهای تثبیت شده در هر سه بستر بعد از ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار رسید در حالی که در مورد سلولهای آزاد ماکزیمم مقدار پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد. همه بسترها به جهت تکرار فرآیند تخمیر به کار گرفته شدند. اپتیمم میزان تولید آنزیم توسط سلولهای تثبیت شده با آلژینات کلسیم ۸ روز حفظ گردید. اما این مقدار برای آگارآگار، وژلاتین، به ترتیب ۵ روز و ۳ روز حفظ شد. آلژینات کلسیم به عنوان بستری مناسب و موثر برای تولید بیشتر آنزیم در مقایسه با دیگر ماتریکس های مطالعه شده شناخته شد. تأثیر غلظت آلژینات و بار سلولی اولیه روی تولید آنزیم توسط سلولهای تثبیت شده با آلژینات کلسیم نیز بررسی شد. تولید α- آمیلاز عمدتاً با افزایش غلظت آلژینات بهبود یافته و بازدهی آنزیم در غلظت ۳۰g/l بیشترین مقدار بود. افزایش بار سلولی اولیه از طریق افزایش تعداد بسترها، تولید آنزیم را افزایش داد. نتایج نشان داد که افزایش تعداد بسترهای آلژیناتی تا ۳۰۰ عدد، با افزایش تولید α- آمیلاز همراه بود.

کلمات کلیدی: آلفا آمیلاز، تثبیت سلول،آلژینات کلسیم،آگار آگار، ژلاتین.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

آمیلازها، شامل α-آمیلاز، β- آمیلازوگلوکو آمیلاز از مهمترین آنزیمها، در بیوتکنولوژی محسوب می‌شوند و اهمیت آنها به دلیل کاربرد گسترده‌شان می باشد (۱۰). این آنزیمها کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف نظیر نساجی، کاغذ سازی، نانوایی و صنایع غذایی اعم از تهیه شربتهای فروکتوزوگلوکز، آب میوه‌ها، شیرین کننده ها و نوشیدنیهای الکلی دارند و همچنین به عنوان ترکیبات ضد لک در شوینده ها به کار می روند. کاربرد این آنزیمها امروزه در زمینه پزشکی و شیمی تجزیه نیز گسترده شده است (۸ و ۱۰).

α-آمیلاز، هیدرولیز نشاسته، گلیکوژن و پلی ساکاریدهای مرتبط با آنها را از طریق برش تصادفی پیوندهای $\alpha(1 \rightarrow 4)$ گلیکوزیدی بر عهده دارند که در نهایت واحدهای گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز تولید می کند (۷و۱۰).

α-آمیلاز از انواع جانوران، گیاهان، قارچها، مخمرها، باکتریها و اکتینومیست ها مشتق می شوند اگر چه انواع باکتریایی و قارچی، بیشترین کاربرد را در صنعت دارند. در میان باکتریها گونه های مختلف باسیلوس، مستعدترین تولیدکننده این آنزیم هستند (۸). استفاده از بیوکاتالیزورهای تثبیت شده امروزه توجه بسیاری از بیوتکنولوژیستها را به خود جلب کرده است. تثبیت بیوکاتالیزورها اعم از آنزیمها یا سلولهای حاوی آنزیم، پایداری آنها را در حین عملکرد بالا برده وکیفیت کاتالیز توسط آنها را بهبود می بخشد (۱).

تثبیت، امکان انحصار سلول یا آنزیم فعال کاتالیتیک را در سیستم راکتور، چنان فراهم می کند که از ورود آنها به فاز متحرک که حامل سوبسترا و محصول می باشد جلوگیری می نماید. لذا امکان تخلیص آسانترآنزیم و استفاده مجدد از آن، فراهم می‌شود. تثبیت سلولهای حاوی آنزیم، همواره فواید بیشتری نسبت به تثبیت آنزیم دارد چرا که دیگر احتیاجی به عمل تفکیک و تخلیص آنزیم نبوده و بدین ترتیب در هزینه و زمانی که صرف این فرایند می شود صرفه جویی می گردد (۴و۱۱).

محصولات میکروبی معمولاً هم توسط سلولهای آزاد و هم توسط سلولهای تثبیت شده تولید می شوند. اما استفاده از سلولهای تثبیت شده مزایایی دارد از جمله آنکه تفکیک محصولات از سلول های تثبیت شده در مقایسه با سلول های آزاد آسانتر است. از طرف دیگر امکان تفکیک سلولها و استفاده مجدد از آنها به منظور تکرار فرایند تخمیر فراهم می‌گردد. بدین ترتیب بازدهی سلول بالا می رود (۱).Ramakrishna و همکارانش، موفق شدند با استفاده از سلولهای تثبیت شده *Bacillus cereus* در آلژینات کلسیم و استفاده از آنها در راکتورها میزان تولید این آنزیم را ۲۴ بار افزایش دهند. Adinarayana و همکارانش، تولید آنزیم آلکالین پروتئاز را توسط سلولهای تثبیت شده *Bacillus subtilis* PE11 بررسی کرد و ۷۹/۰۳ ٪ افزایش در تولید این آنزیم را بعد از تثبیت با آلژینات کلسیم گزارش نمودند (۱). Anna و همکارانش، از آگار-آگار جهت تثبیت سلولهای *Bacillus circulans ATCC 21783* به منظور تولید Cyclodextrin glucanotransferase استفاده کردند (۲). Adinarayana تعداد دفعات تکرار تخمیر توسط سلولهای تثبیت شده *Bacillus subtilis* PE11 را ۹ مرحله گزارش کرد (۱). مشابه با این آزمایش را Beshay روی باکتری، *Teredinobacter turnirae* به منظور تولید آنزیم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آلکالین پروتئاز انجام داد و تعداد دفعات تکرار تخمیر توسط سلولهای تثبیت شده فوق در آلژینات کلسیم را ۶ بار گزارش کرد (۴).

در این تحقیق سعی شده است که تأثیر تثبیت سلولی بر میزان تولید آنزیم آمیلاز توسط یک سویه بومی باسیلوس بررسی شود. لذا، سه بستر متفاوت شامل آلژینات کلسیم، آگار آگاروژلاتین جهت تثبیت مقایسه شدند. همچنین امکان استفاده مجدد از سلول‌های تثبیت شده فوق برای تولید آنزیم α-آمیلاز تحت شرایط تخمیر تکراری بررسی شد.

مواد و روش کار

نمونه برداری و تشخیص باسیلوسهای مولد آلفا آمیلاز:

باکتری مورد مطالعه یک سویه باسیلوس (*Bacillus spp.*) مولد آلفا آمیلاز است، که از خاک محتوی کود دامی از منطقه‌ای واقع در استان گیلان (آستانه) جدا گردید. بدین ترتیب که بعد از جداسازی چندین نمونه مختلف از باکتریها، نمونه هایی که بر اساس (Bergy´s Manual Systematic Bacteriology) باسیلوس شناسایی شدند، برای تشخیص فعالیت آلفا-آمیلازی به محیط های " نشاسته آگار" که حاوی نوترینت آگار به همراه ۱٪ نشاسته می‌باشد، منتقل شدند.کشت به طریقه نقطه ای انجام شد و پلیت ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور (۳۷°c) قرار داده شدند. نمونه‌های آمیلاز مثبت، پس از ریختن چند قطره محلول لوگل، با ظهور هاله ای شفاف اطراف کلونی که به دلیل هیدرولیز نشاسته موجود در محیط کشت است، مشخص شدند. سپس نسبت قطر هاله به قطر کلونی بر حسب (mm)، برای هر باکتری اندازه‌گیری شد (۶).

کشت در سیستم غوطه ور:

به منظور افزایش بیومس سلولی و تقویت باکتریها، ۳ لوپ از هر کلنی از لوله کشت، به (۵۰cc) محیط پیش کشت در ارلن به حجم(۲۵۰cc) منتقل و سپس در انکوباتور شیکردار با دمای (۳۷°c) و دور (۱۳۰rpm) قرار داده شدند، این محیط حاوی ترکیبات ذیل برحسب (g/l) می باشد: نوترینت براث (۸) عصاره گوشت (۱۰) عصاره سویا (۱۰) نشاسته (۱۰) نمک طعام (۵). بدین ترتیب پس از ۲۴ ساعت بیشترین بیومس سلولی حاصل شد. محیط تولید، محیط نهایی برای تولید آنزیم است. لذا ۵ درصد از محیط پیش کشت به ۵۰cc از محیط تولید در ارلن های ۲۵۰cc تلقیح گردید و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°c و دور ۱۳۰rpm قرار داده شدند. این محیط حاوی ترکیبات ذیل، بر حسب (g/l) می باشد: نشاسته (۱۰) عصاره سویا (۵) عصاره گوشت (۳) کلرید کلسیم (۰/۵) سولفات منیزیم (۰/۳)فسفات دی هیدروژن پتاسیم (۰/۴).

سنجش فعالیت α-آمیلاز به روش کیفی در سیستم غوطه ور:

بعد از کشت هر باکتری در محیط کشت براث، در فواصل زمانی مختلف، ۱ml از هر محیط برداشت شد و با ۱ml محلول نشاسته ۱٪ مخلوط گردید. سپس این مخلوط حدود ۱۵-۱۰ دقیقه در بن ماری قرار گرفت. در فواصل زمانی ۲ دقیقه به ۲ دقیقه، یک قطره از این مخلوط بر روی یک لام تمیز قرار گرفت و یک قطره

لوگل به آن اضافه شد. در دقایق اول نمونه ها رنگ آبی تیره ایجاد می کردند که به دلیل حضور نشاسته هیدرولیز نشده بود که بعد از گذشت حدود ۱۵ دقیقه از نشاسته موجود کاسته شده و رنگ آن روشن تر می شد. در نمونه های انتهایی نیز رنگ آبی محیط، کاملاً از بین رفته و فقط رنگ ید دیده شد. زیرا نشاسته کاملاً در محیط تجزیه شده بود. این تست کیفی نشان دهنده این است که باکتری در این محیط آنزیم α-آمیلاز را تولید کرده که منجر به هیدرولیز نشاسته محلول شده است. بنابراین می توان بعد از سانتریفوژ کردن محیط از آن به عنوان محلول آنزیمی استفاده کرد.

تهیه محلول آنزیم:

۵ cc از محیط تولید برداشت شد و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد بدین ترتیب محلول رویی حاوی آنزیم می باشد که تا زمان سنجش در شیشه های استریل در یخچال نگهداری می شدند.

سنجش فعالیت α-آمیلاز به روش کمی در سیستم غوطه ور:

در اینجا مطابق با روش Bernfeld در سال ۱۹۴۵، قندهای احیا کننده حاصل از واکنش، با استفاده از معرف قلیایی سدیم ۳ و۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری شدند. مطابق با این روش (۰/۵cc) از محلول نشاسته ۱٪ حل شده در بافر فسفات (۰/۱M) با pH=7 و (۰/۵cc) محلول آنزیمی را در دو لوله جداگانه در شرایط کاملاً استریل در درجه حرارت (۵۵°c) قرار می دهیم تا هم دما شوند. سپس آنها را مخلوط کرده و (۱۵) دقیقه اجازه داده می شود تا واکنش صورت گیرد. بعد از آن واکنش با اضافه کردن (۱cc) محلول (DNS) متوقف می شود. محلول حاصله به مدت ده دقیقه جوشانده شده و سپس با اضافه کردن (۱۰cc)آب مقطر حجم نهایی آن به (۱۲cc) می رسد. سپس میزان قند احیا کننده حاصل را توسط اسپکتروفوتومتر با خواندن جذب نوری در (۵۴۰nm) تعیین گردید. جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم با استفاده از محلول stock مالتوز (۲۰۰mg/ml) منحنی استاندارد رسم شد. طبق این روش یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول قند احیاکننده را در مدت یک دقیقه تحت شرایط واکنش آزاد کند. بدین ترتیب نمونه های منتخب بر اساس این روش با هم مقایسه شدند و بهترین سویه انتخاب شد(۳).

تهیه مایه تلقیح:

محتویات ارلن حاوی محیط پیش کشت، به مدت ۱۰ دقیقه در (۳۰۰۰rp) سانتریفوژ شد و رسوب سلولی بدست آمده به ترتیب توسط محلول کلرید پتاسیم (۲۰g/l) و محلول کلرید کلسیم شسته شد. سرانجام توده سلولی در محلول کلرید سدیم (۹g/l) به شکل سوسپانسیون تهیه شد و از آن به عنوان مایه تلقیح استفاده شد (۱).

تثبیت سلول با استفاده از آلژینات:

از آلژینات سدیم، محلول ژله ای (۳٪) تهیه گردید. بدین منظور هر ۳g آلژینات سدیم در ۱۰۰cc آب جوش حل شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°c اتو کلاو شد. محلول آلژینات با ۲cc سوسپانسیون سلولی مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد تا محلول یکدستی شکل گیرد.

سپس مخلوط حاصل توسط سرنگ استریل از فاصله ۵cm به محلول کلرید کلسیم ۰/۲M به شکل قطره قطره اضافه گردید و سپس به مدت یک ساعت در ۴°c قرار داده شد.گویچه های حاصل، جهت حذف سلولهای باقی مانده در سطح، با آب مقطر استریل ۳ تا ۴ بار شسته شدند و تا زمان استفاده، در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد در یخچال نگهداری می شدند (۱).

تثبیت سلول در آگار - آگار:

با استفاده از محلول کلرید سدیم (۰/۹٪)، ۱۸cc محلول ژله ای آگار - آگار با غلظت ۲٪، تهیه و توسط اتوکلاو، استریل شد. (۲cc) سوسپانسیون سلولی به محلول مذاب آگار - آگار اضافه گردید و به مدت چند ثانیه توسط شیکر خوب مخلوط شدند. سپس به شکل مکعب هایی با سایز ($۴mm^۳$) برش داده شدند و به بافر فسفات (pH=۷) ۰/۱M اضافه شدند و در یخچال به مدت یک ساعت قرار داده شدند تا خوب شکل بگیرند. سپس مکعبها از بافر خارج شده و با آب مقطر ۳ تا ۴ بار شسته شدند (۱).

تثبیت سلول در ژلاتین:

۵cc سوسپانسیون سلولی به ۱۵cc ژلاتین استریل ۲۰٪ اضافه گردید و در پتری دیش های استریل ریخته و در دمای ۴۵°c قرار داده شد. سپس سطح ژله با ۱۰cc گلوتر آلدهید ۵ ٪ پوشانده شد تا در °c ۳۰ بسته شود. قطعه حاصله به شکل مکعبهایی با سایز ($۴ mm^۳$) برش داده شدند و سپس مکعبها با آب مقطر استریل شسته شدند تا مازاد گلوتر آلدهید زدوده شود (۱).

تولید آنزیم توسط سلولهای تثبیت شده:

در این مرحله گویچه ها و مکعبهای تثبیت شده به ارلن‌های با حجم ۲۵۰cc محتوی ۵۰cc محیط تولید مشابه محیط سلول های آزاد منتقل شدند و در انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷°c و دور ۱۳۰rpm قرار داده شدند و هر ۶ ساعت یک بار فعالیت آنزیم در آنها سنجیده شد (۱).

اندازه گیری رشد سلول و نشت سلولهای تثبیت شده:

رشد سلولی در محیطهای حاوی سلولهای آزاد و میزان نشت سلولها از ماتریکسهای تثبیت شده در محیط از طریق اندازه گیری میزان جذب نوری در طول موج (۶۰۰nm) هر ۶ ساعت یک بار سنجیده شدند (۱و۴).

مقایسه میزان تولید آنزیم هنگام استفاده مجدد از سلول های تثبیت شده در تکرار فرایند تخمیر:

بدین منظور هر ۲۴ ساعت یک بار محیط کشت سلولهای تثبیت شده با محیط کشت جدید جایگزین شد. بدین ترتیب که بسترها با آب مقطر شسته و به محیط کشت جدید منتقل شدند و قبل از هر بار تعویض میزان تولید آنزیم در آنها بررسی شد (۱و۴).

مناسب ترین غلظت ژل آلژینات برای تثبیت:

برای یافتن اپتیمم غلظت آلژینات جهت تثبیت، محلولهای آلژینات با غلظتهای مختلف (g/l ۳۵-۳۰-۲۵-۲۰) به کار گرفته شد و در هر مورد میزان تولید آنزیم و وزن خشک سلول بررسی شد (۴).

تأثیر بار سلولی اولیه(ICL) بر تولید آنزیم:

تعداد گویهای آلژینات که با غلظت ۳٪ تهیه شده بودند از ۱۰۰ تا ۴۰۰ تا تغییر داده شدند و میزان تولید آنزیم در آنها مقایسه شد (۴).

نتایج

بررسی رشد سلول و تولید آنزیم در *Bacillus SP.* (BC18) جدا شده از خاک در فاصله های زمانی ۶ ساعته نشان داد که این باکتری در حالت آزاد بعد از ۴۸ ساعت وارد فاز رکود می شود و تولید آنزیم توسط آن در انتهای فاز لگاریتمی به ماکسیمم مقدار می رسد (نمودار۱).

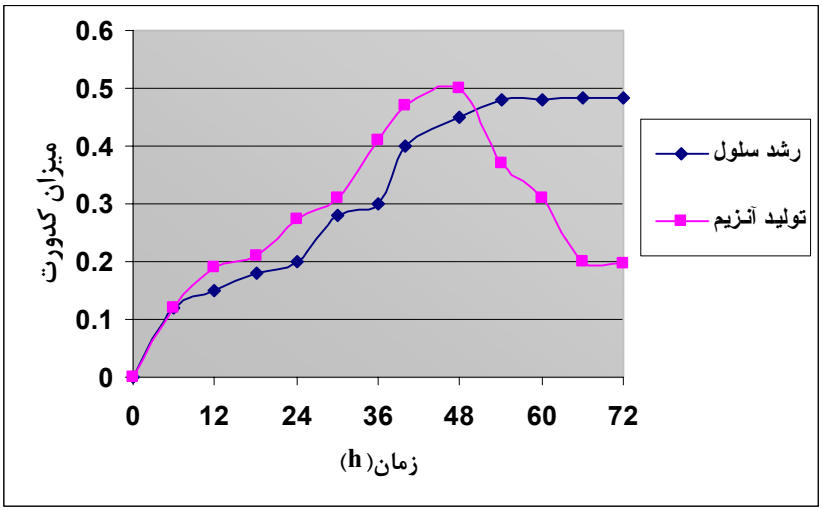
بعد از تثبیت سلول در آلژینات، ماکزیمم میزان تولید آنزیم که در سلولهای آزاد معادل ۷/۳۸ U/mL بود، ۲۰/۸۳٪ افزایش یافت. تولید آنزیم توسط سلولهای تثبیت شده در آگار- اگار کمتر از سلولهای آزاد بود و در ژلاتین کمترین مقدار در مقایسه با سایر بسترها بود (نمودارهای ۲، ۳، ۴ و ۵).

میزان نشت سلول در آگار آگار بیشتر از آلژینات بود و در ژلاتین بیشترین مقدار نشت نسبت به سایر بسترها مشاهده شد (نمودار۶).

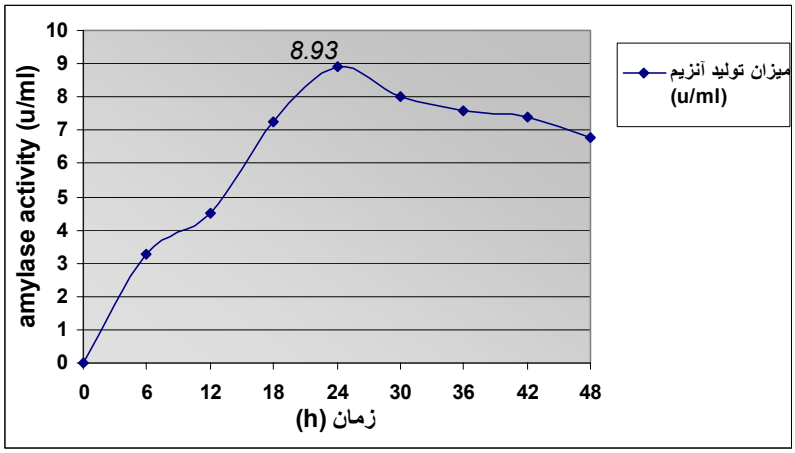
مقایسه میزان تولید آنزیم هنگام استفاده مجدد از سلول‌های تثبیت شده جهت تکرار فرایند تخمیر نشان داد، که برای سلولهای تثبیت شده در آلژینات کلسیم تا ۸ مرحله امکان تکرار وجود داشت.که مدت هر مرحله ۲۴ ساعت بود. البته در هر مرحله میزان بسیار اندکی از تولید کاهش می یافت. نتیجه تست فوق برای سلولهای تثبیت شده در آگار-آگار و ژلاتین به ترتیب ۵ و ۳ دوره ۲۴ ساعته بود. (نمودار۷).

با افزایش غلظت ژل از ۲۰g/l تا۳۰g/l میزان تولید آنزیم افزوده و میزان نشت سلولی کاهش می یابد. ولی در ۳۵g/l علاوه بر کاسته شدن میزان نشت سلول میزان تولید آنزیم نیز کاسته می شود (نمودار۸).

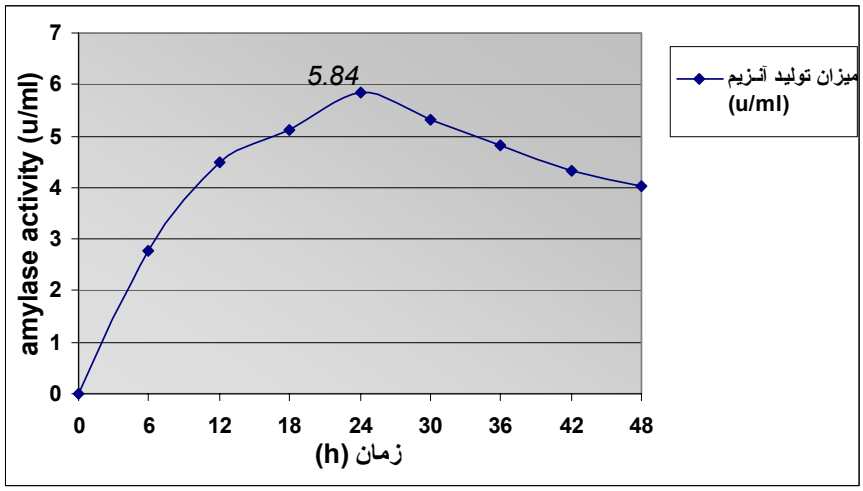
افزایش گویهای آلژیناتی تا ۳۰۰ عدد با افزایش میزان تولید آنزیم همراه بود ولی از آن پس از میزان تولید کاسته می‌شود (نمودار۹).



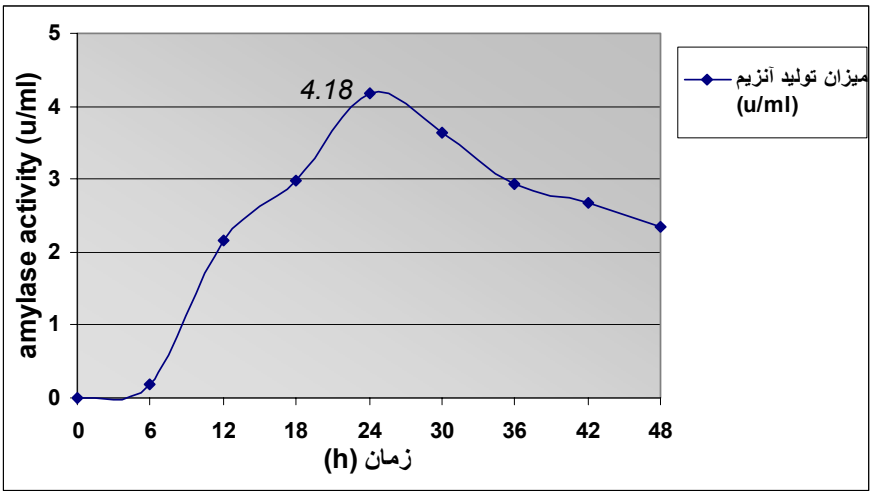
نمودار۱: رشد سلول و تولید آنزیم به روش کدورت سنجی در باکتری به فرم آزاد: این باکتری در حالت آزاد بعداز ۴۸ ساعت وارد فاز رکود می شود و تولید آنزیم توسط آن در انتهای فاز لگاریتمی به ماکزیمم مقدار می رسد.



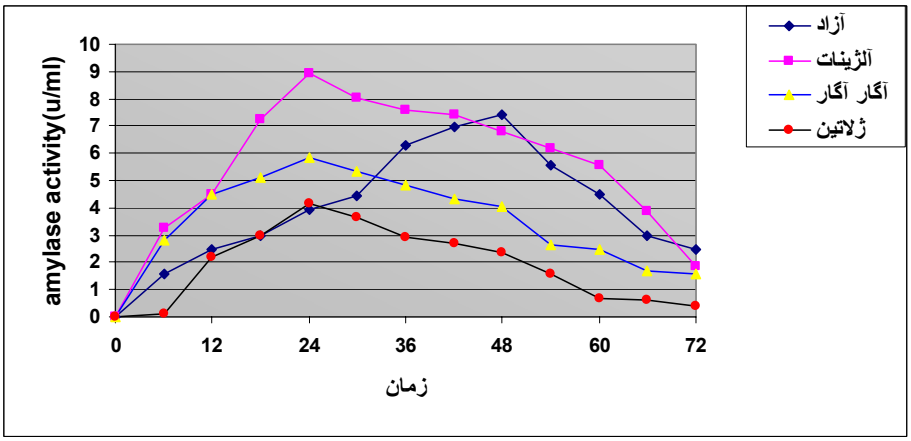
نمودار۲: تولیدآنزیم بر حسب زمان در باکتری تثبیت شده در آلژینات: میزان تولید آنزیم بعد از ۲۴ ساعت به حداکثر مقدار می‌رسد.



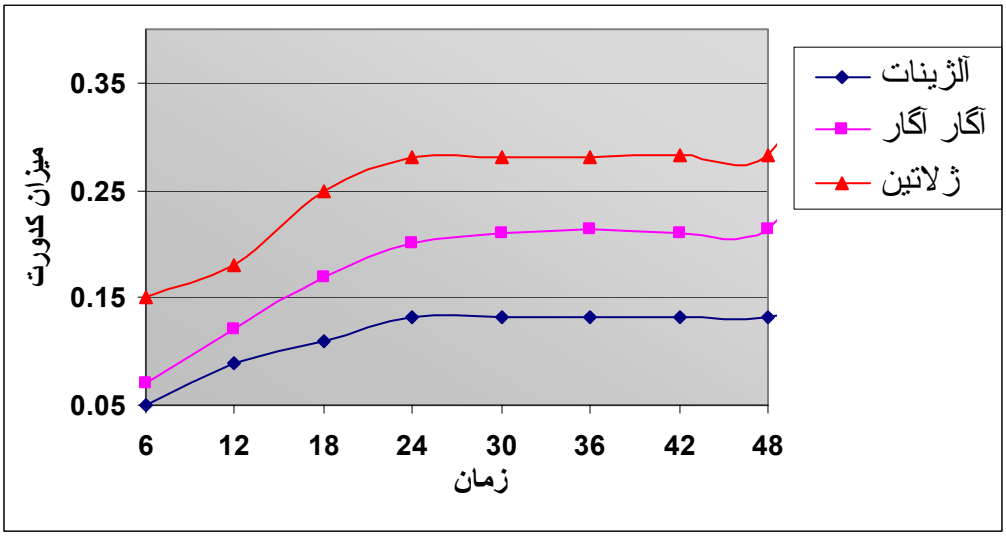
نمودار۳: تولید آنزیم برحسب زمان در باکتری تثبیت شده با آگار – آگار: میزان تولید آنزیم بعد از ۲۴ ساعت به حداکثر مقدار می‌رسد.



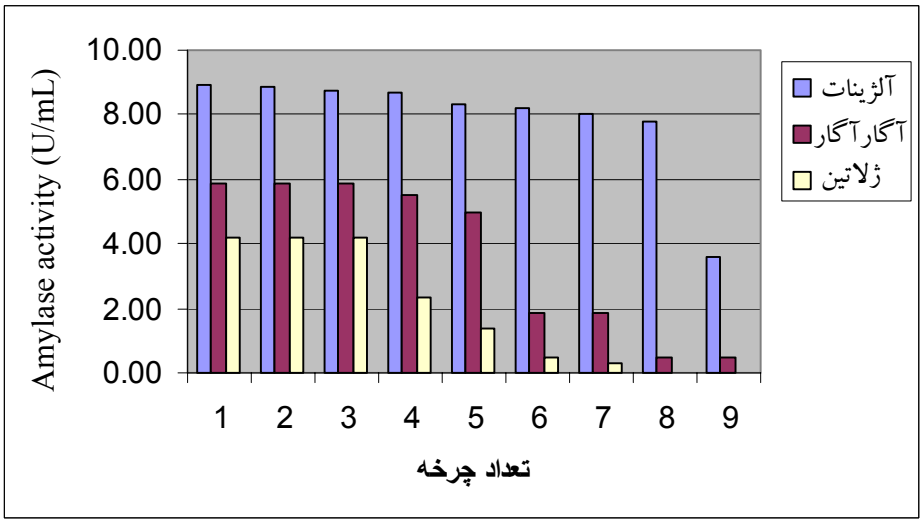
نمودار٤: تولید آنزیم بر حسب زمان در باکتری تثبیت شده در ژلاتین: میزان تولید آنزیم بعد از ۲۴ ساعت به حداکثر مقدار می‌رسد.



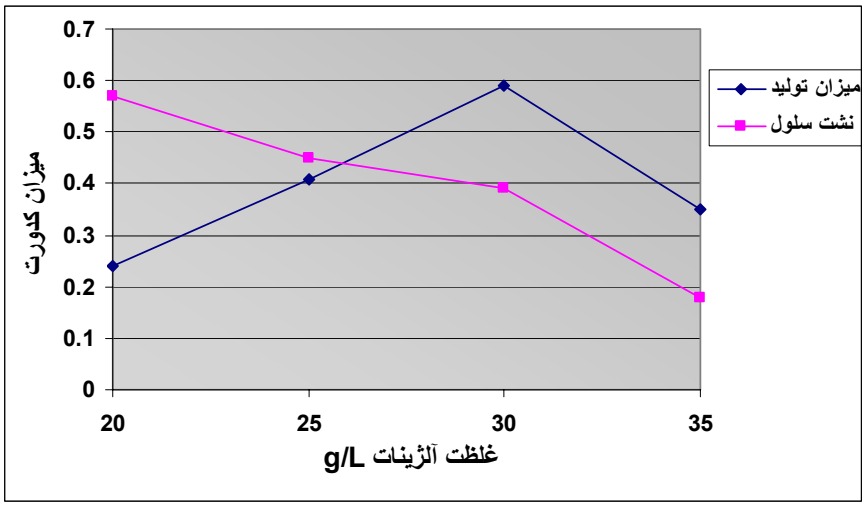
نمودار٥: مقایسه تولید آنزیم در باکتری آزاد و تثبیت شده در سه بسترمختلف: پس از تثبیت، مدت زمان لازم برای رسیدن تولید آنزیم به ماکزیمم مقدار، از ۴۸ ساعت به ۲۴ ساعت رسیدو همان طور که مشاهده می‌شود، ماکزیمم تولید آنزیم در باکتریهای تثبیت شده درآلژینات، بیش ازباکتریها ی آزاد و تثبیت شده در سایر بسترها می‌باشد.



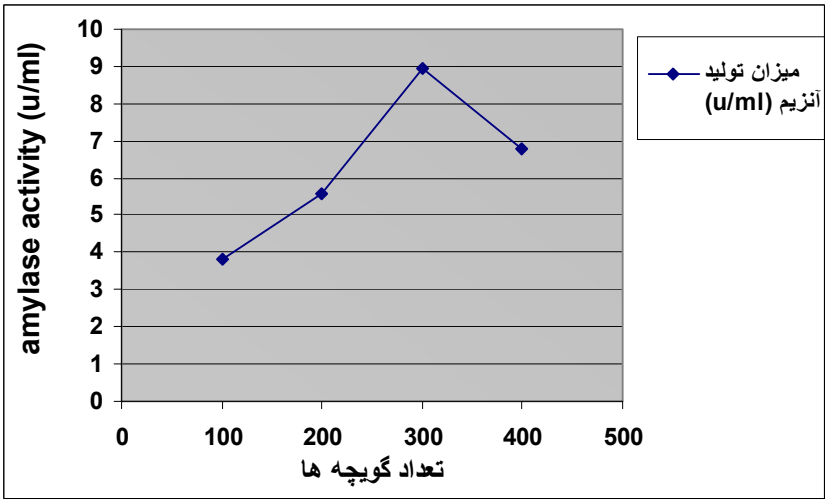
نمودار۶: مقایسه نشت سلول از سه بستر مختلف استفاده شده جهت تثبیت سلول: ژلاتین در مقایسه با سایر بسترها، بیشترین مقدار نشت را نشان می‌دهد. میزان نشت سلول در آگار - آگار نیز بیشتر از آلژینات می باشد. و همانطور که مشاهده می شود نشت سلول در هر سه بستر، تا ۲۴ ساعت ادامه داشته، پس از آن ثابت می گردد.



نمودار۷: تولید آنزیم آلفاآمیلاز در کشت های متناوب سلول های تثبیت شده در سه بستر مختلف: برای سلولهای تثبیت شده در آلژینات کلسیم تا ۸ مرحله ۲۴ ساعته امکان تکرار وجود دارد.که در هر مرحله میزان بسیار اندکی از تولید کاهش می یابد. نتیجه تست فوق برای سلولهای تثبیت شده در آگار-آگار و ژلاتین به ترتیب ۵ و ۳ دوره ۲۴ ساعته می باشد.



نمودار۸: تأثیر غلظت آلژینات بر تولید آنزیم و نشت سلولهای تثبیت شده در این بستر: با افزایش غلظت ژل از ۲۰g/l تا ۳۰ g/l میزان تولید آنزیم افزوده ومیزان نشت سلولی کاهش می یابد.ولی در ۳۵g/l علاوه بر کاسته شدن میزان نشت سلول میزان تولید آنزیم نیز کاسته می شود



نمودار۹: تأثیر بار سلولی اولیه بر تولید آنزیم از طریق افزایش تعداد گویچه های آلژیناتی: افزایش گویهای آلژیناتی تا ۳۰۰ عدد با افزایش میزان تولید آنزیم همراه بود ولی از آن پس، از میزان تولید کاسته می شود.

بحث

چنانچه از نتایج بر می آید، در صورت انتخاب بستر مناسب، تثبیت سلولی می تواند تکنیکی مناسب برای افزایش بهره وری سلول باشد. به طوری که در این تحقیق، آلژینات کلسیم به عنوان بستری مناسب و موثر برای تولید بیشتر آنزیم در مقایسه با دیگر ماتریکس‌های مطالعه شده شناخته شد. طبق نتایج به دست آمده ماکزیمم میزان تولید آنزیم توسط سلولهای تثبیت شده در آلژینات، نسبت به سلولهای آزاد افزایش حاصل کرد. Ramakrishna و همکارانش، همچنین موفق شدند با استفاده از سلولهای تثبیت شده *Bacillus cereus* با آلژینات کلسیم و استفاده از آنها در راکتورها میزان تولید این آنزیم را ۲۴ بار افزایش دهند (۱).

Adinarayana و همکارانش، تولید آنزیم آلکالین پروتئاز را توسط سلولهای تثبیت شده *Bacillus subtilis* PE11 بررسی نمودند. میزان تولید در سلولهای تثبیت شده در آلژینات ۷۹/۰۳٪ افزایش پیدا کرد (۱).

طبق نتایج حاصله، تثبیت در ژلاتین، با کاهش تولید همراه بود. و علت این کاهش تولید را، می توان گلوترآلدهید به کار رفته، جهت سفت شدن ژلاتین دانست که احتمالاً برای سلولها سمی می باشد. Adinarayana و همکارانش نیز، به نتیجه ای مشابه دست یافتند، به طوری که تولید آنزیم آلکالین پروتئاز توسط سلولهای تثبیت شده *Bacillus subtilis* PE11 در ژلاتین با کاهش همراه بود (۱).

طبق نتایج، زمان رسیدن تولید آنزیم به ماکزیمم مقدار، بعد از تثبیت کاهش می‌یابد که شاید دلیلی بر کاهش رشد سلول‌ها بعد از تثبیت باشد. این در حالی است که اگر میزان رشد سلول‌های آزاد و میزان نشت سلول‌های تثبیت شده در بسترهای مختلف را معرف وزن خشک سلول در نظر بگیریم، نتایج بدست‌آمده، نشان می‌دهند که زمان رسیدن به ماکزیمم مقدار وزن خشک سلول نیز بعد از تثبیت کاهش یافته‌است. Adinarayana و همکارانش، با تثبیت سلول‌های باسیلوس سوبتیلیس در بسترهای مختلف، میزان تولید آنزیم آلکالین پروتئاز توسط این سلول‌ها را بررسی کردند. آنها ضمن مقایسه وزن خشک سلول در حالت آزاد و تثبیت شده مطابق روش فوق، به نتایج مشابه دست یافتند (۱). Srinivasulu و همکارانش، تأثیر تثبیت سلول را بر تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین توسط سلول‌های *S.mariensis* بررسی نمودند. طبق نتایج آنها وزن خشک سلول‌های آزاد نهایتاً تا 120h افزایش داشت و ماکزیمم تولید آنزیم نیز در آنها بعد از 144h مشاهده شد. در حالی‌که این مقادیر بعد از تثبیت به ترتیب به 96h و 120h تقلیل یافت. آنها گزارش نمودند که اگرچه رشد سلولی *S.mariensis* بعد از تثبیت کاهش یافته‌است ولی غلظت تولید محصول بیشتر شده است که این می‌تواند به دلیل فعال شدن فاکتورهای بیوسنتتیک باشد (۹).

نتایج نشان می دهدکه تفکیک سلول تثبیت شده از محیط، آسانتر از سیستمهای سلولی معلق می باشد. که همین امر، امکان کشتهای مجدد سلول و در نتیجه افزایش تولید را فراهم می سازد. تولید در چرخه های اولیه ناشی از رشد سلول می باشد ولی با افزایش تکرار چرخه ها، سلولها طبیعتاً با کمبود اکسیژن و مواد غذایی مواجه می شوند ولی به سطح بسترآمده و تولید را ادامه می دهند. Beshay ، با بررسی تولید آنزیم alkalin protease توسط باکتری تثبیت شده *Teredinobacter turnirae* به دلایلی مشابه اشاره نموده است (۴).

همان طور که مشاهد شد با افزایش غلظت ژل آلژینات نشت سلول کاهش می یابد که نشان دهنده بالا رفتن دوام بستر ها می باشد. ولی این افزایش غلظت بعد از حد معین، باعث کاهش تولید آنزیم می گردد. می‌توان نتیجه گرفت که افزایش غلظت ژل کاهش نفوذپذیری و در نتیجه کاهش میزان انتشار سوبسترا از ژله را به همراه دارد که با نتایج Dobreva و همکارانش (۵) و Fumi و همکارانش، مطابقت دارد.

در این تحقیق ماکزیمم مجاز برای افزایش تعداد گویها ۳۰۰ عدد به دست آمد. Beshay نیز نتیجه گرفت که افزایش تعداد گویها تا حدی معین، با افزایش تولید آنزیم همراه است و نشان داد که افزایش

تعداد گویها تا ۴۰۰ عدد باعث افزایش تولید آنزیم می‌گردد و از آن پس، میزان تولید آنزیم را کاهش می‌دهد. محدودیت در افزایش تعداد گویها را، می‌توان نتیجه کاهش میزان مواد غذایی محیط نسبت به تعداد بسترها دانست (۴).

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه همکاران به ویژه سرکار خانم کتایون داستان که در انجام این تحقیق کمک شایانی کردند، سپاسگزاری می شود.

منابع

1. Adinarayana, K. and Bezavada, J., 2005. Production of alkalin protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis PE-11* in Various Matrices by entrapment Thechnique. AAPS Pharm SciTech, vol.6, pp.391-397
2. Anna, V.; Nigar, B. and Venko, B., 2003. Cyclodextrin glucanotransferase production by free and agar gel immobilized cells of *circulances Atcc 21783*.Proc Biochem, vol.38, pp. 1585-1591.
3. Bernfield, P., 1995. *Methods in Enzymology*, vol.1, pp.149-158.
4. Beshay, y., 2003. Production of alkalin protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in ca-alginate beads.African Journal of Biotechnology, vol. 2, pp.60-65.
5. Dobreva, E.; Ivanova, V. and Tonkova, A., 1996. Influence of the immobilization conditions on the efficiency of a-amylase production by *Bacillus Licheniformis*.Proc Biochem, vol.31, pp. 229-234.
6. Dhanasekaran, D. and Sivamani, P., 2006. Studies on Free and Immobilized cells of *Bacillus* species on the production of Alpha amylase .The internet Gournal of Microbiology, vol.2, pp. 4-7.
7. Gangad, H. and Dhanya, S., 2006. Solid culturing of *Bacillus Amyloliqufaciens* for Alpha amylase production. Biotechnol, vol.44, pp.269-274.
8. Kiran, O. and Camlekcioglu, A., 2004. Effects of carbon Sources and various chemicals on the production of a Novel Amylase From a Thermophilic *Bacillus sp.k-12*. Turk J Biol, vol.29, pp. 99-103.
9. Srinivasual, B. and Ellaiah, P., 2005. Production of Neomycin Using Immobilized cells of *Streptomyces Mariensis Nuv – 5*. Saudi pharma ceutical Jouranl, vol.13, pp.74-82.
10. UI Qader, Sh., 2006. Enhanced production and Extra cellular activity of commercically important Amylolytic Enzyme by a Newly Isolated strain of *Bacillus .sp.AS-10*.Turk J Biochem, vol.l31, pp.135-140.
11. Zeynep, B. and Ural, A., 2002. Immobilization of Yeast cells in several conducting polymer matrices .J.SCI-PURE Appl.CHEM,vol.39,pp.183-197